

证 明

REC'D 28 MAY 2003

WIPO PCT

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 10 24

申 请 号： 02 1 37620.4

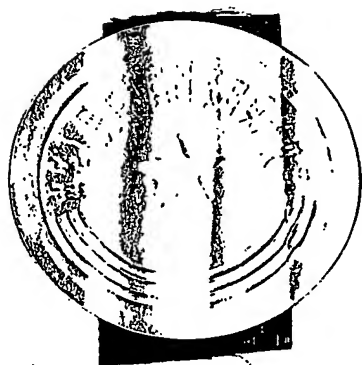
申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 一种多指标并行检测的蛋白芯片检测系统

申 请 人： 上海数康生物科技有限公司

发明人或设计人： 胡赓熙

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2003 年 4 月 15 日

权 利 要 求 书

1. 一种多指标并行检测的蛋白芯片检测系统, 由用于多指标并行检测的蛋白芯片、以一定浓度配比制成的, 并带有发光标记的多蛋白混合液即反应液、一系列已知浓度且浓度递增的被测蛋白的混合液即标准品、和洗涤液组成, 其特征在于其中所述的标准品溶液配方为: 40%-60%胎牛血清+各种高浓度纯化抗原+0.02-0.1% NaN_3 或PH7.0-7.8 0.05M PB +2-30%BSA+1.5-2.5%蔗糖+0.02-0.1% NaN_3 +各种高浓度纯化抗原。

2. 一种如权利要求 1 所述的蛋白芯片检测系统的制备方法, 其中蛋白芯片制备包括下列步骤:

1) 确定多种不同的被测物蛋白, 简称目标蛋白 A 和 A 特异性的抗原、抗体或受体等, 简称 B, 如体内疾病标志性蛋白和能与之特异结合的多种蛋白;

2) 将上述所述 B 即不同的蛋白探针以一定浓度溶于包被液中, 然后用芯片自动点样系统将这些蛋白质点制在固相载体上, 点样密度 25-200 点/ cm^2 , 点样量 0.1-10ng/点;

3) 4 度放置过夜;

4) 用封闭液将蛋白芯片封闭;

5) 干燥处理, 储存于 4 度;

其特征在于其中所述的包被液配方为: pH 为 7.0-8.0 的 PB。

3. 一种如权利要求 2 所述的蛋白芯片检测系统的制备方法, 其特征在于其中所述的封闭液配方为: 含 1-9%BSA, 1-9% 蔗糖, 0.1-1% NaN_3 的 PB。

说明书

一种多指标并行检测的蛋白芯片检测系统

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种多指标并行检测的蛋白芯片检测系统及制备方法。

背景技术

生物芯片技术是九十年代中期兴起的一种新型生物学技术，它基于生物大分子（核酸、蛋白质等）间相互作用的大规模并行分析方法，并结合微电子、微机械、化学、物理、计算机等多领域的技术，将生命科学研究中所涉及的样品反应、检测、分析等过程连续化、集成化、微型化，已成为当今生命科学研究领域发展最快的技术之一。

生物芯片可以广泛应用于农业、环境、食品、法庭、军事、科研等领域。不仅如此，由于生物芯片可同时检测多种疾病相关基因或蛋白，从而对遗传病、肿瘤、传染性疾病进行辅助诊断，所以它还具有重要的临床应用价值。

生物芯片主要分为三大类：核酸芯片、蛋白芯片和芯片实验室。

蛋白芯片是检测蛋白质之间相互作用的生物芯片。目前研究中的蛋白芯片技术大多基于抗原和抗体特异性结合的原理，将多种蛋白质结合在固相基质（如：特殊处理的玻片、有机膜片、硅微球等）上，检测生物样品所含有的可与之专一性结合的对应蛋白质。

蛋白芯片可通过发现体内特定蛋白质的含量变化，准确地对生理/病理变化作出判断。在临床诊断领域，蛋白芯片具有广阔的应用前景。

本发明人在中国专利 01105023.3 中已公开了一种能同时检测多指标的蛋白芯片检测系统及制备方法，实现了对一些特异性高但在体液中含量很低蛋白的临床同时检测。

发明内容

本发明所要解决的技术问题，是在原申请 01105023.3 基础上，对蛋白芯片检测系统加以改进，以增加检测系统的稳定性，提高检测灵敏度。

中国专利申请 01105023.3 中已公开了一种用于多指标并行检测的蛋白芯片检测系统，该检测系统包括：

- (1) 用于多指标并行检测的蛋白芯片；
- (2) 以一定浓度配比制成的，并带有发光标记的多蛋白混合液

即反应液;

(3) 一系列已知浓度且浓度递增的被测蛋白的混合液即标准品;

(4) 一种蛋白芯片的洗涤液。

本发明修改了被测蛋白标准品溶液的配方, 使不同蛋白质混合后不会丧失活性, 增加了其稳定性, 提高了检测的准确性。

所述的已知浓度且浓度递增的被测蛋白 (或称目标蛋白 A) 的标准品溶液配方为 40%-60% 胎牛血清 + 各种高浓度纯化抗原 + 0.02-0.1% NaN_3 或 $\text{pH} 7.0-7.8$ 0.05M PB ($\text{KH}_2\text{PO}_4-\text{Na}_2\text{HPO}_4$) + 2-30% BSA + 1.5-2.5% 蔗糖 + 0.02-0.1% NaN_3 + 各种高浓度纯化抗原。该一系列已知浓度且浓度递增的目标蛋白 A 的混合液配制后冻干保存。

本发明所要解决的另一技术问题是提供一种改进的上述检测系统中的蛋白芯片的制备方法。

本发明所述蛋白芯片包括固相载体和固定于载体上用于多指标并行检测的蛋白, 该蛋白芯片是利用芯片自动点样系统, 通过物理吸附或共价结合的方式, 将多种蛋白质以一定的排列次序固定在固相载体上; 然后用封闭液将固相载体的非点样部位封闭, 干燥保存。蛋白质可以是抗原、抗体、受体、配体等, 进一步指能与体内疾病性标志蛋白特异结合的蛋白, 尤其是肿瘤标志性蛋白。

其中所述的固相载体可以是无机片基或有机化合物片基, 无机片基包括半导体硅片、玻璃片、微孔硅片、微孔玻璃片等, 优选玻璃片; 有机片基包括醋酸纤维素膜、硝酸纤维素膜, 尼龙膜, 聚丙烯膜等。

该蛋白芯片是通过下述技术方案获得的:

1、确定多种不同的被测物蛋白 (简称目标蛋白 A) 和 A 特异性的抗原、抗体或受体等 (简称 B), 如体内疾病标志性蛋白和能与之特异结合的多种蛋白;

2、将上述所述 B 即不同的蛋白探针以一定浓度溶于包被液中, 然后用芯片自动点样系统将这些蛋白质点制在固相载体上, 点样密度 $25-200$ 点/ cm^2 , 点样量 $0.1-10\text{ng}/\text{点}$;

3、4 度放置过夜;

4、用封闭液将蛋白芯片封闭;

5、干燥处理, 储存于 4 度;

为了使芯片上所点的多种蛋白质在发生一系列反应后产生的光信号能在相邻两个数量级上 (最强点/最弱点 < 100), 以便于检测仪器的检测, 事先调节了芯片上蛋白质的浓度。(最适点样浓度)。

本发明提供的包被液配方为 pH 为 $7.0-8.0$ 的 PB ($\text{KH}_2\text{PO}_4-\text{Na}_2\text{HPO}_4$)。

本发明提供的封闭液配方为: 含 1-9% BSA, 1-9% 蔗糖, $0.1-1\%$ NaN_3 的 PB ($\text{KH}_2\text{PO}_4-\text{Na}_2\text{HPO}_4$)。其优点是: BSA 都有封闭作用,

蔗糖是惰性物质，能隔绝空气，BSA 和蔗糖可作为支持框架结构的物质。封闭液的作用使固相载体的其他部位不能结合蛋白质，从而保证实验数据的准确性。

本发明在制备方法中缓冲液配方的改进与原发明相比降低非特异性吸附，减少背景信号值；并增加了蛋白芯片的稳定性，提高了检测的灵敏度。

附图说明

图 1 为本发明改进缓冲液配方的制备方法制备的蛋白芯片信号图象

图 2 为原发明制备方法制备的蛋白芯片信号图象

具体实施方式：

实施例一、用改良后的缓冲液（包括封闭液、包被液）配方制备肿瘤检测蛋白芯片与以原有缓冲液配方制备的蛋白芯片背景和信号值比较

1、用改进缓冲液配方的蛋白芯片制备方法制备蛋白芯片 E：

1.1 将 AFP、CEA、PSA、free-PSA、CA125、CA15-3 六种肿瘤标志物的对应抗体（一抗）以一定浓度溶于包被液中，然后用芯片自动点样系统将这些蛋白质点制在固相载体上，点样密度 48 点/cm²，点样量 0.5ng/点，每种一抗对应点 4 个平行点；

1.2 4 度放置过夜；

1.3 用封闭液将蛋白芯片封闭 1 小时；

1.4 干燥处理 2 小时，储存于 4 度备用。

其中用到的包被液配方为 pH 为 7.8 的 PB (KH₂PO₄-Na₂HPO₄)。

其中用到的封闭液配方为：3%BSA，5% 蔗糖，0.5%NaN₃ 的 PB (KH₂PO₄-Na₂HPO₄)。

2、用原蛋白芯片制备方法制备蛋白芯片 F

其中用到的包被液配方为 pH 为 9.6 的 CBS (NaHCO₃-Na₂CO₃)。

其中用到的封闭液配方为：含 0.2%Tween20，0.1%酪氨酸，5%BSA，4%蔗糖，0.5%proclin 的 TBS。

将上述蛋白芯片 E、F 与配套的反应液、洗液、和已知浓度的血清样品反应，（剩余的血清样品留待下一次实验使用）。并用生物芯片检测仪进行拍摄和数据分析。信号值如表 1 所示：

	芯片 E	芯片 F
AFP	925	1035

CEA	2995	2906
PSA	2170	2201
Free-PSA	2017	1978
CA125	913	879
CA153	1082	1033

(表 1)

将上述芯片 4℃ 贮存放置, 6 个月后与取上述实验中同一批号地反应液、洗液、和上述的剩余血清样品反应, 信号值如表 2 所示:

	芯片 E	芯片 F
AFP	875	477
CEA	2630	1486
PSA	2140	864
Free-PSA	1087	671
CA125	906	311
CA153	972	557

(表 2)

与蛋白芯片 F 相比, 按本发明的缓冲液配方制备的蛋白芯片 E 其稳定性明显增加。

另外, 由生物芯片拍摄出的蛋白芯片 E 信号图象见图 1, 蛋白芯片 F 信号图象见图 2。由两图可见, 图 1 的背景明显低于图 2。

实施例二、用改良后的标准品缓冲液配方制备标准品与原有标准品稳定性比较

1. 以如下配方配制标准品缓冲液: 60% 胎牛血清 + 各种高浓度纯化抗原 + 0.05% NaN_3 , 另加入 60 μl AFP, CEA, NSE 高浓度纯化抗原制成标准品溶液 A;
2. 以如下配方配制标准品缓冲液: PH7.8 0.05M PB (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4) + 15% BSA + 2.5% 蔗糖 + 0.05% NaN_3 , 另加入 60 μl AFP, CEA, NSE 高浓度纯化抗原制成标准品溶液 B;
3. 按原有配方配制标准品缓冲液, 另加入 60 μl AFP, CEA, NSE 高浓度纯化抗原制成标准品溶液 C。

注: 溶液 A、B、C 中的 AFP、CEA、NSE 终浓度是一致的。

将以上三种标准品溶液冻干, 分别是标准品 a、b 和 c, 用化学发光自动分析仪进行标定, 标定的浓度值结果如表 3:

肿瘤标志物	单位	标准品 a	标准品 b	标准品 c
AFP	ng/ml	728	709	711
NSE	ng/ml	1862	1830	1875
CEA	ng/ml	1161	1163	1172

(表 3)

将 a、b、c 三种标准品贮存于 4℃，放置 3 个月后，用同一台化学发光自动分析仪进行复标，标定的浓度值结果如表 4：

肿瘤标志物	单位	标准品 a	标准品 b	标准品 c
AFP	ng/ml	731	705	352
NSE	ng/ml	1799	1803	1007
CEA	ng/ml	1095	1168	409

(表 4)

与原有缓冲体系制备的标准品 c 相比，标准品 a、b 的浓度更为稳定，可保存更长的时间不丧失活性。

说明书附图

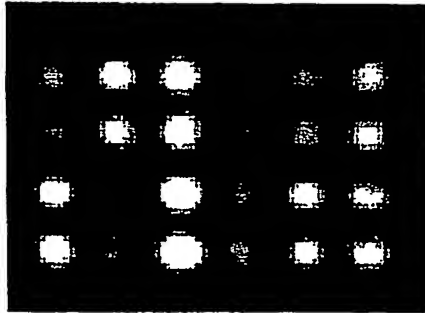


图 1

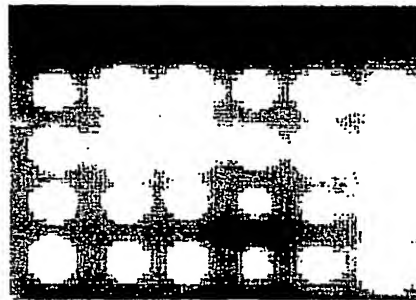


图 2